

## 論文内容の要旨

Combinatorial CRISPR/Cas9 Approach to Elucidate a Far-Upstream Enhancer Complex for Tissue-Specific Sox9 Expression

CRISPR/Cas9 を用いた軟骨発生に必須の転写因子 Sox9 の組織特異的エンハンサーを含んだ転写複合体の解明

日本医科大学大学院医学研究科 整形外科学分野

大学院生 田畑 祐輔

Developmental Cell, 46 (6), (2018)掲載

## 内容要旨

軟骨細胞の分化や発生に必須の役割を持つ転写因子として SOX9 (SRY-box9) が挙げられる。SOX9 遺伝子もしくはその周辺の突然変異により先天性骨軟骨形成異常症 (Campomelic Dysplasia; CD, Acampomelic Campomelic Dysplasia; ACD)を引き起こすことが知られており、患者の遺伝子解析などから SOX9 上流約 1Mb までの遺伝子間領域においていくつかのエンハンサー領域が報告されている。しかしながら SOX9 遺伝子とその上流遺伝子 KCNJ2 の間には約 2Mb という非常に巨大な遺伝子間領域が存在しており、エンハンサー領域がこの中に散在性に存在していること、またそれら複数のエンハンサーが協調して SOX9 の発現を制御しているという事実に加え、体系的にエンハンサー領域や上流遺伝子を同定する手法に関しても困難な点が多く、現在でも完全には解明されていない。そのため、今回の研究目的として、体系的に SOX9 を活性化させる軟骨特異的エンハンサー領域や SOX9 自体を制御する転写因子を同定することで、軟骨における SOX9 の転写制御システムを明らかにしたいと考えた。

方法として、まず近年報告された遺伝子改変を可能とする CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) /Cas system を用いて、Sox9 のプロモーター領域近傍に設計した guide RNA (gRNA) と deactivated Cas9 (dCas9) をレトロウイルスによりマウスの初代肋軟骨細胞に対し遺伝子導入後、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)を施行した。その結果、Sox9 上流約 1Mb の領域 (RCSE)に強いピークを認めることを突き止めた。この RCSE 領域は種の保存性を満たしており、ヒストンのエンハンサーマーカーである H3K27ac や H3K4me1 での ChIP においても有意なピークを認めた。

この RCSE 領域の機能を評価するために、転写抑制複合体である SIN3A を含んだ dCas9 を RCSE 領域に結合させたところ、肋軟骨細胞において Sox9 の発現が有意に低下し、C3H10T1/2 細胞を用いた軟骨分化では、Sox9 発現が低下し軟骨分化が抑制された。そして肋軟骨細胞を用いた 3C (Chromosome conformation capture)を施行した結果、1Mb も離れた Sox9 プロモーターと RCSE 領域のアソシエーションを確認し得た。さらにこの RCSE と Sox9 プロモーターを発現させた LacZ-トランスジェニックマウスを作成・解析した結果、肋軟骨特異的な染色パターンを認めた。さらには RCSE 領域を欠失させたノックアウトマウスを作成し骨格標本にて解析したところ、肋軟骨を含んだ胸郭のみの低形成・狭小化を認めた。さらに切片を作成し解析した結果、大腿骨では差を認めない一方、ノックアウトマウスの肋軟骨のみで増殖軟骨細胞層の減少、肥大軟骨細胞層の増大を認め、今回の RCSE 領域が肋軟骨特異的エンハンサーであることが強く示唆された。

最後に、この RCSE 領域近傍に gRNA を設計し、同様の手法で dCas9 を結合させ ChIP-MS を施行し同定した全ての転写因子を siRNA でスクリーニングした結果、Sox9 自体の発現を制御する転写因子として Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3)を同定し得た。軟骨細胞のセルラインである ATDC5 を用いたルシフェラーゼアッセイでは、Sox9 プロモーターと RCSE 領域の存在下で Stat3 を導入すると活性が有意に上昇した。さらには Stat3 抗体を用いた ChIP では Sox9 プロモーター、RCSE 共に有意なピークを認め、肋軟骨細胞を用いた免疫染色では核の濃染を確認し得た。そして C3H10T1/2 細胞を用いた軟骨分化で shRNA を用い Stat3 を抑制した結果、分化に伴い Sox9 の発現が低下し、有意に軟骨細胞分化が抑制された。最後に Stat3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し解析したところ、全身の骨格低形成、また明らかな骨化の遅延を認め、Stat3 が RCSE 領域を介して Sox9 の発現を制御していることを突き止めた。

今後、我々の結果が CD や ACD の診断につながり、さらには同様の手法を用いることで未知のエンハンサー領域を同定出来る可能性がある。